

Федеральное государственное автономное учреждение высшего  
профессионального образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

---

На правах рукописи

МУНАВИРОВ Булат Василевич

**ВЛИЯНИЕ ЛИПИДНОГО СОСТАВА И ПРИСУТСТВИЯ ПОЛИМЕРОВ  
НА ЛАТЕРАЛЬНУЮ ДИФФУЗИЮ И СОСТОЯНИЕ ЛИПИДОВ В  
МОДЕЛЬНЫХ БИОМЕМБРАНАХ**

Специальность 01.04.07 – физика конденсированного состояния

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени кандидата  
физико-математических наук

Казань 2013

Работа выполнена на кафедре физики молекулярных систем ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель:

**Филиппов Андрей Васильевич**

доктор физико-математических наук, профессор

Официальные оппоненты:

**Севрюгин Вячеслав Анатольевич**

доктор физико-математических наук, профессор,  
профессор кафедры теоретической физики и  
методики обучения физике Марийского  
государственного университета

**Двояшкин Нариман Камилович**

доктор физико-математических наук, профессор,  
декан факультета нефти и газа Альметьевского  
государственного нефтяного института

Ведущая организация:

ФГБ УН Казанский институт биохимии и  
биофизики КазНЦ РАН, г. Казань

Защита состоится «3» октября 2013 года в «14» часов «00» минут на заседании диссертационного совета Д 212.081.15 при Казанском Федеральном университете по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте Казанского (Приволжского) федерального университета <http://www.kpfu.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2013 года.

Ученый секретарь диссертационного Совета,  
доктор физико-математических наук,  
профессор

Еремин М.В.

**Актуальность проблемы.** Липиды - один из классов сложных молекул, насчитывающий тысячи видов, присутствующий в клетках и тканях животных и растений. Липиды участвуют в разнообразных биохимических процессах, однако их важнейшие функции проявляются в составе биологических мембран. Формируя основу биологической мембраны, они напрямую ответственны за целостность клетки и ее сообщение с внешней средой. В последние годы традиционное представление о биологической мембране как однородном липидном бислое, (жидкостно-мозаичная модель Сингера и Николсона [1]) претерпело существенное изменение. Использование современных физических методов показало, что в составе липидного бислоя присутствуют области, в которых липиды упакованы более плотно, а подвижность молекул заторможена, по сравнению с основной матрицей [2, 3]. В литературе их называют «упорядоченные домены» или «рафты». «Рафтам» приписывают ключевую роль во многих важных функциях биомембраны: они участвуют в передаче сигналов внутри клетки и вовне ее, внутриклеточном транспорте липидов, апоптозе, экзо- и эндо- цитозе; «рафты» необходимы для нормального функционирования большинства мембранных белков [2, 3]. Особую роль «рафтам» отводят в развитии заболеваний, связанных с разрушением биомембран белками, принимающими ненативные, «токсичные» конформации: болезни Паркинсона, Альцгеймера, прионные заболевания и т. д. [4]. Причины и механизмы образования «рафтов» до сих пор однозначно не установлены. Некоторые исследователи считают, что они могут быть связаны с самопроизвольным жидкостным фазовым разделением многокомпонентной липидной матрицы. В этом процессе особая роль отводится специфическим липидам, относящимся к фосфатидилхолинам, сфинголипидам и холестеринам [5]. Изучению роли холестерина на фазовое разделение уделялось большое внимание, однако влияние состава и взаимодействия двух других липидных компонент остается мало изученным. Другие группы исследователей полагают, что более важная роль в образовании «рафтов» принадлежит макромолекулам (мембранным и плазматическим белкам) [6].

Значение взаимодействия между липидами и макромолекулами определяется не только его ролью в живом организме. В последние годы липидные системы все больше используются в фармацевтике для приготовления «умных» систем направленной доставки и регулируемого выпуска лекарств [7]. При этом липидные везикулы или иные структуры модифицируют природными или синтетическими макромолекулами, в частности, полиэтиленгликолем или полиакриловой кислотой.

Таким образом, исследование влияния липидного состава и присутствия макромолекул на неоднородность структуры и динамики молекул в липидных бислоях является актуальным для изучения функционирования биомембран и биотехнологии липидных систем.

Особыми преимуществами при исследовании состояния биологических систем и подвижности биологических молекул, в том числе липидов, обладает метод ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [8, 9]. Используя данные ЯМР спектроскопии  $^{31}\text{P}$ ,  $^2\text{H}$  и  $^1\text{H}$ , может быть получена информация о геометрии и упорядоченности структур, образуемых липидами при их взаимодействии с водой и между собой, а методика ЯМР-диффузометрии позволяет исследовать латеральную диффузию молекул липидов и обнаруживать латеральное фазовое разделение в бислоях.

**Цель работы** состояла в установлении роли состава бислоя, образуемого липидными молекулами, принимающими участие в образовании упорядоченных доменов биологических мембран («рафтов»), а также присутствия макромолекул в липидной системе, образующей бислой, на фазовое состояние, латеральное разделение, характеристики локальной и трансляционной подвижности молекул липидов, особенности встраивания макромолекул в бислой, а также изучение возможностей методов ЯМР (ЯМР спектроскопии на ядрах  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$ , ЯМР диффузометрии, двумерной NOESY ЯМР спектроскопии) для исследования неоднородностей липидных мембран.

**Научная новизна.** В работе получены следующие новые результаты:

1. С помощью метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля получены экспериментальные данные о самодиффузии в макроскопически ориентированных липидных мембранах синтетического и природных сфингомиелинов, их смесей с фосфатидилхолином, а также в липидных мембранах в присутствии био- и синтетических полиионов.

2. На основании данных самодиффузии мембран сфингомиелинов обнаружена зависимость ширины распределения коэффициентов латеральной диффузии от степени неоднородности природных сфингомиелинов различного происхождения по длине молекулы и степени насыщенности углеводородных цепей, свидетельствующая о динамической и структурной гетерогенности бислоев.

3. Показано, что в мембранах, образованных из смеси фосфатидилхолина и сфингомиелина происходит сближение коэффициентов латеральной диффузии липидов, которое обусловлено усреднением свободных объемов в соответствующих однокомпонентных бислоях.

4. По данным  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопии и дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что взаимодействие полиэтиленгликоля с липидами в мультибислоях фосфатидилхолина приводит к понижению температуры и уменьшению кооперативности фазового перехода гель-жидкость.

5. На основании комплекса данных по  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ , двумерного NOESY ЯМР и ЯМР-диффузометрии показано, что полиэтиленгликоль и полиакриловая кислота не проникают вглубь липидного бислоя, а адсорбируются в области гидрофобно-гидрофильной интерфазы.

6. Показано, что, в зависимости от концентрации, полиакриловая кислота может образовывать два типа комплексов с липидами мембраны. Оценены стехиометрия и динамические параметры комплексов.

7. Обнаружено, что основной вклад в адсорбцию периферических пептидов полилизина на бислоях фосфатидилхолина, фосфатидил-глицерина и их смесей дает электростатическое взаимодействие. Адсорбция приводит к появлению спектра коэффициентов латеральной диффузии липидов, что объясняется образованием латеральных доменов, при этом и сам полипептид также образует агрегаты.

**Практическая значимость**

1. Получены экспериментальные данные, свидетельствующие об особенностях пространственного расположения макромолекул в модельных липидных мембранах, изменении термодинамических параметров, динамики

липидных молекул в следующих водных системах, имеющих практическое значение для фармацевтики: полиэтиленгликоль-липид, полиакриловая кислота-липид и полилизин-липид.

2. Разработанные методические подходы для установления структуры систем полиэтиленгликоль-липид, полиакриловая кислота-липид и полилизин-липид, основанные на использовании  $^3\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ , двумерного NOESY ЯМР и ЯМР-диффузометрии, могут быть применены при изучении широкого класса полимер-липидных систем.

3. Экспериментальные результаты, полученные для однокомпонентных, многокомпонентных липидных и полимер-липидных систем, могут быть использованы для развития теоретических представлений о процессах формирования упорядоченных липидных доменов («рафтов») в биологических мембранах.

### **На защиту выносятся положения, сформулированные в выводах.**

**Апробация работы.** Основные результаты работы были доложены и обсуждены на XIV, XV, XVI и XVII Всероссийских конференциях «Структура и динамика молекулярных систем» г.Казань; IV и V Зимних молодежных школах-конференциях «Магнитный резонанс и его приложения», г.Санкт-Петербург; XI международной школе молодых ученых «Actual problems of magnetic resonance» г.Санкт-Петербург; Международной конференции Euromag & NMRCM 2008, г.Санкт-Петербург; Международной конференции «NMR triple celebrating meeting», Оулу (Финляндия); на семинарах кафедры физики молекулярных систем КПФУ в 2009-2012 годах.

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 6 статей в центральной печати, 6 статей в сборниках научных работ, 11 тезисов докладов на всероссийских и зарубежных конференциях.

**Личный вклад автора.** Автору принадлежат экспериментальные результаты. Автор принимал непосредственное участие в постановке задачи, планировании и проведении экспериментов, обсуждении материала статей и литературном оформлении полученных результатов.

### **Структура диссертации.**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, заключения, списка работ автора по теме диссертации и списка цитируемой литературы, включающего 174 наименований. Работа изложена на 117 страницах, содержит 39 рисунков, 2 таблицы.

### **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

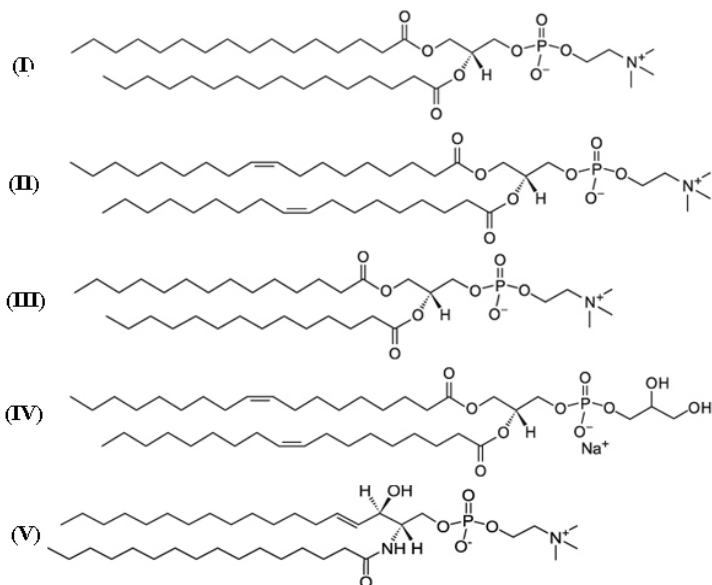
Во «Введении» в форме аннотированного изложения глав диссертационной работы приводятся ее основные результаты, обосновывается актуальность темы, формулируется цель диссертации, обосновывается новизна, научная и практическая значимость проведенных исследований.

**Первая глава. «Структурные особенности организации липидных систем. Взаимодействия липид-липид и липид-макромолекула, их влияние на структуру системы и трансляционную подвижность молекул липидов».** Глава посвящена обзору современных теоретических представлений и экспериментальных данных о липидных системах. Рассмотрены условия образования латеральных фазовых доменов, роль холестерина, фосфолипидов и сфинголипидов. Обсуждаются известные представления о взаимодействии макромолекул с липидными мембранами и их роль в латеральном фазовом разделении. Дан обзор теоретических основ используемых в работе методик ЯМР. Обсуждаются возможности методов ЯМР для исследования структуры липидных систем, трансляционной подвижности липидов, взаимодействия липидов между собой и с различными полимерами.

**Вторая глава. «Материалы и методы исследования»** содержит характеристики используемых в данной работе липидов, полимеров и других веществ. Описаны методики приготовления липидных везикул и макроскопически ориентированных липидных образцов, особенности получения одномерных и двумерных спектров ЯМР, измерения трансляционной подвижности в макроскопически ориентированных модельных липидных бислоях методом ЯМР-диффузометрии. Обсуждаются подходы к обработке полученных результатов, приведены основные характеристики использованной экспериментальной аппаратуры, применяемых импульсных последовательностей и наиболее значимые экспериментальные настройки. Приводятся особенности метода дифференциальной сканирующей калориметрии, применительно к исследуемым системам, и характеристики калориметра.

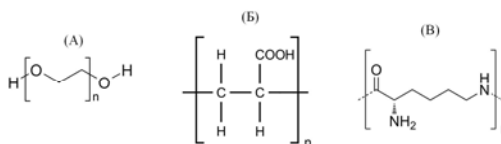
#### Исследуемые системы.

Для приготовления мембран использовали синтетические аналоги природных фосфолипидов (Рис.1), включающих фосфатидилхолины (ФХ) дипальмитоилФХ (ДПФХ), диолеоилФХ (ДОФХ) и димиристоилФХ (ДМФХ); сфингомиелины (СМ): пальмитоилСМ (ПСМ); а также три сфингомиелина природного происхождения, экстрагированные из яичного желтка (яСМ), мозга (мзСМ) и молока (млСМ) коровы. В ряде экспериментов, наряду с цвиттерионными ФХ и СМ, использовали анионный диолеоилфосфатидилглицерин (ДОФГ). Все липиды приобретены в Avanti Polar Lipids, Inc. (США).



**Рис. 1.** Структурные формулы использованных в работе липидов: I – ДПФХ, II – ДОФХ, III – ДМФХ, IV – ДОФГ, V – РСМ.

Для создания полимер-липидных композиций использовали синтетические полимеры структурные формулы которых представлены на Рис.2, а некоторые свойства, важные в контексте данной работы, в Таблице 1. Все полимеры приобретались в Sigma Aldrich, Inc. (США).

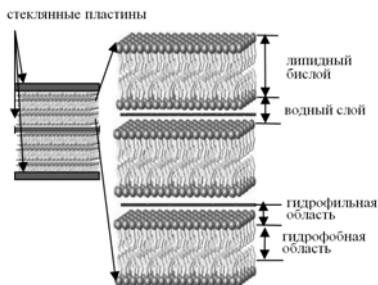


**Рис. 2.** Структурные формулы использованных в работе макромолекул: А – полиэтиленгликоль, (ПЭГ), Б – полиакриловая кислота (ПАК), В – полилизин (ПЛ).

**Таблица 1.** Свойства использованных в работе макромолекул

Наименование	Молекулярная масса	Заряд
Полиэтиленгликоль	2кДа, 6кДа, 20кДа	Нейтральный
Полиакриловая кислота	5 кДа	Отрицательный
Полилизин	0,66 кДа, 25,2 кДа	Положительный

Основным объектом исследований были макроскопически ориентированные на стеклянных пластинках бислои фосфолипидов (Рис.3), детальное описание приготовления которых можно найти в [9,10]. В отдельных случаях использовали мультислойные везикулы, приготовленные стандартным методом.



**Рис. 3.** Схематическое изображение макроскопически ориентированных на стеклянных пластинках бислоев липидов.

### Экспериментальные методы.

В соответствии с поставленной целью в работе применялся комплекс физических методов исследования: латеральная подвижность в липидных мембранах исследовалась с помощью метода ЯМР диффузометрии; информация о структурной организации, фазовом состоянии и латеральном фазовом разделении липидов была получена на основании данных ЯМР спектроскопии на ядрах  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$ ; особенности фазового перехода гель-жидкий кристалл в липидных бислоях исследовались с применением сравнительного анализа термограмм ДСК и температурной зависимости формы спектров  $^1\text{H}$ , детали взаимодействия макромолекул с липидами были изучены с помощью двумерной NOESY ЯМР спектроскопии.

Исследования латеральной подвижности производились на диффузомере кафедры физики молекулярных систем КПФУ: частота  $^1\text{H}$  ЯМР 64 МГц, максимальная амплитуда импульсного градиента магнитного поля 30 Тл/м и диффузомере Varian/Chemagnetics CMX кафедры проектирования устойчивых процессов Технологического Университета Лулеа (г. Лулеа, Швеция): частота  $^1\text{H}$  ЯМР 360 МГц, максимальная амплитуда импульсного градиента магнитного поля 1.15 Тл/м. Использовалась трехимпульсная последовательность стимулированного эхо,  $90^\circ\text{-}\tau\text{-}90^\circ\text{-}\tau_1\text{-}90^\circ\text{-}\tau\text{-}\text{эхо}$ . Диффузионное затухание стимулированного спинового эхо (ДЗ) в случае однокомпонентной неассоциированной жидкости в свободном объеме, представляет собой зависимость амплитуды эхо (A) от параметров последовательности ( $\delta$ , g,  $t_d$ ) и коэффициента самодиффузии молекул (D, КСД):

$$A(2\tau, \tau_1, g) = \frac{A(0)}{2} \exp\left(-\frac{2\tau}{T_2} - \frac{\tau_1}{T_1}\right) \exp\left(-\gamma^2 \delta^2 g^2 D t_d\right), \quad (1)$$

где  $T_1$  и  $T_2$ - времена спин-решеточной и спин-спиновой релаксации, соответственно,  $\gamma$  - гиромагнитное отношение, g - амплитуда градиентного импульса,  $\delta$  - длительность импульса градиента,  $t_d$  - время диффузии. Время диффузии при проведение эксперимента варьировалось в интервале 7-250 мс. Датчики в обоих приборах были оборудованы гониометрами, позволяющими производить ориентацию образца в магнитном поле. Таким образом, в частности, достигалась ориентация нормали к бислоям липидов под



«магическим углом» (54,7°) по отношению к внешнему магнитному полю, тогда тепловое движение молекул липидов приводит к частичному усреднению диполь-дипольного взаимодействия в системе, что позволяет существенно сузить линии спектра, уменьшить времена поперечной ЯМР релаксации и, таким образом, наблюдать сигнал ЯМР [10]. При такой ориентации образца коэффициент латеральной диффузии  $D_L$  (КЛД) и измеряемый коэффициент самодиффузии КСД липидов связаны следующим образом:  $D_L = 1,5 \cdot D$ .

При наличии достаточных оснований для представления диффузионного затухания как мультикомпонентного производили его разделение на экспоненциальные составляющие вида (1), для чего, в условиях перекрывания линий спектра липидов, совместно анализировали информацию, полученную из градиентного и частотного каналов, используя метод Стилбса (CORE) [11].

Спектры  $^{31}\text{P}$  ЯМР везикул и ориентированных мультибислоев записывали на частоте 145 МГц используя одноимпульсную последовательность без подавления взаимодействия с  $^1\text{H}$ .

Эксперименты по двумерному NOESY ЯМР проводились на спектрометре Bruker Avance-400 (приборная база КФТИ КазНЦ РАН), с частотой резонанса на ядрах  $^1\text{H}$  400 МГц и временами смешивания  $t_{\text{mix}} = 400\text{--}500$  мс. Использовали везикулярные суспензии. Частота вращения под «магическим углом» образца, помещенного в 4 мм циркониевый ротор составляла 8 кГц.

Калориметрические измерения производились на приборе MicroCal VP-DSC (Тэбю, Швеция). Использовались везикулярные суспензии с концентрацией липидов 2 ммоль. Термограммы получались в последовательности из 4 сканирований нагревание-охлаждение в интервале температур 5-60°C.

**Третья глава. «Особенности латеральной диффузии липидов, участвующих в образовании латеральных доменов («rafts»), в одно- и двух-компонентных липидных бислоях»** посвящена обсуждению оригинальных результатов, полученных методом ЯМР, при исследовании подвижности фосфатидилхолинов, сфингомиелинов и их эквимольных смесей в макроскопически ориентированных бислоях. ДПФХ и ПСМ были однородны по составу, в то время как природные сфингомиелины содержали по несколько десятков различных молекул и, в связи с этим характеризовались широким распределением молекул по длине углеводородной части (Рис.4а). Информация о подвижности липидов была получена из анализа формы диффузионного затухания (ДЗ), а изменение энергетики самодиффузии (энергии активации самодиффузии,  $E_D$ ) определяли путем аппроксимации температурных зависимостей КЛД липидов уравнением типа Аррениуса:

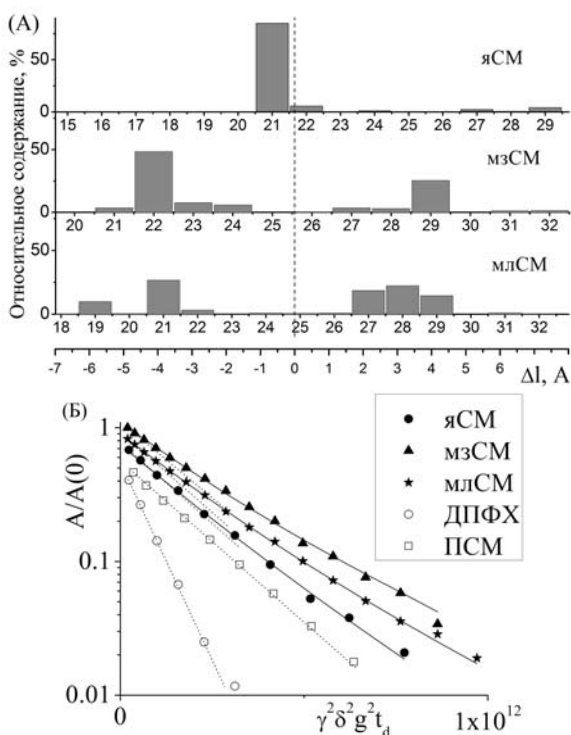
$$D_L = D_0 \exp\left(\frac{E_D}{R \cdot T}\right), \quad (2)$$

где  $D_0$  – предэкспоненциальный фактор, независящий от температуры;  $E_D$  – кажущаяся энергия активации для диффузии,  $RT$  – тепловая энергия,  $R$  – универсальная газовая постоянная.

Температурная (20-60°C) зависимость КЛД (средних КЛД в случае природных СМ) при этом имеет вид близкий к «аррениусовой» функции (Рис.5а), что позволило определить кажущуюся энергию активации

латеральной диффузии. Полученные для ДПФХ значения  $E_D=36$  кДж/моль хорошо согласуются с литературными данными [9,13],  $E_D$  для бислоев сфингомиелинов лежат в интервале 40-44 кДж/моль.

Анализ ДЗ (Рис.4б) показал, что бислои однородных синтетических липидов ДПФХ и ПСМ (также как и других синтетических липидов: ДМФХ, ДОФХ, ДОФГ) характеризуются однокомпонентным ДЗ и единственным КЛД, что согласуется с литературными данными [9]. При этом, несмотря на сходство структуры и близость молекулярных масс, КЛД ПСМ в  $\sim 2$  раза меньше чем у ДПФХ. Подобное различие объясняется более плотной упаковкой липидов в бислоях сфингомиелинов, за счет дополнительного межмолекулярного взаимодействия в области интерфазы, при котором амидная группа одной молекулы СМ выступает как донор, а кислород карбоксильной группы второй молекулы СМ как акцептор.



**Рис.4.** (А) Распределение отклонений длин углеводородных цепей природных СМ от средних значений, рассчитанное из данным масс-спектропии [12]. (Б) ДЗ, полученные для однокомпонентных ориентированных мультибислоев. Пунктирными линиями отмечены наклоны, соответствующие средним КЛД, сплошными – результат двухкомпонентного описания ДЗ, основанного на анализе методом CORE. ДЗ сдвинуты вдоль оси ординат для удобства. Температура 50°C

В отличие от синтетических фосфолипидов, ДЗ сфингомиелинов, имеющих природное происхождение и неоднородный состав, характеризуются средним КЛД близким к КЛД ПСМ, однако форма ДЗ для них отличается сложным неоднородным видом (Рис.4б). Используя CORE анализ ДЗ было показано, что в данном случае появление спектров КЛД является следствием структурной неоднородности бислоев. Таким образом, распределение по размерам молекул в природных СМ приводит к латеральному разделению однокомпонентных бислоев на домены, которые содержат молекулы с различными наборами длин цепей.

Используя фракции фосфатидилхолинов с различными длинами цепей нами были приготовлены искусственные неоднородные фосфатидилхолины. Однако для таких систем ДЗ были однокомпонентными, а значит в жидкой фазе латерального фазового разделения не происходило, либо образовывались короткоживущие домены.

Эквимольные смеси ФХ и СМ используются в качестве так называемой «канонической смеси» (в смеси с холестерином (ХОЛ)) для создания бислоев, в которых происходит самопроизвольное разделение на две жидкие фазы одна из которых (более упорядоченная) обогащена СМ, а другая ФХ [3,5,9]. Мы исследовали бинарные смеси ДОФХ с ДПФХ и всеми имеющимся СМ. Несмотря на то, что при одинаковых условиях, КЛД в однокомпонентном бислое ДОФХ был существенно больше, чем КЛД в однокомпонентных бислоях второго фосфолипида (Рис.5а), в смесях наблюдали однокомпонентные ДЗ. Это свидетельствует о том, что ДОФХ однородно смешивается со вторым фосфолипидом и, даже если в однокомпонентном СМ наблюдается фазовое разделение, в смесях с ДОФХ происходит усреднение трансляционной подвижности.

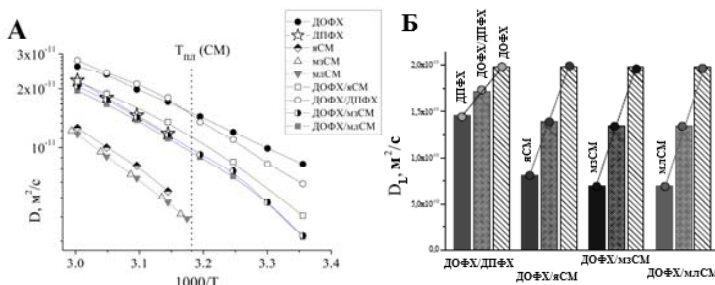
Вид зависимостей КЛД от температуры зависит от интервала температур. В низкотемпературной области (Рис.5а,  $< T_{пл}$  СМ) КЛД отклоняются в сторону более низких значений от продолжения зависимостей Аррениусового типа, полученных в высокотемпературной области ( $> T_{пл}$  СМ). Анализ показал, что это не может быть связано с изменением состава жидкой фазы бислоя при выделении доменов гелей фазы ДПФХ или СМ в низкотемпературной области. Действительно, присутствие доменов гелей фазы подтверждается данными дифференциальной сканирующей калориметрии. Наиболее вероятно, что их основной эффект на наблюдаемый КЛД заключается в образовании препятствий для диффузии молекул в жидкой фазе.

Качественное описание латеральной диффузии липидов дает теория свободного объема [14], которая связывает КЛД с величиной свободной поверхности бислоя ( $a_f$ ), приходящейся на одну молекулу липида:

$$D_L = D^* \exp \left( \frac{-\beta \cdot a^*}{a_f} \right), \quad (3)$$

где  $D^*$  - константа, а  $a^*$ -критическое значение свободной поверхности, которое должно присутствовать около диффундирующей частицы для совершения диффузионного «прыжка»,  $\beta$  – фактор перекрывания свободных объемов. Эта теория была применена для описания КЛД в высокотемпературной области смесевых бислоев при использовании литературных значений  $a_f$  для однокомпонентных бислоев [9,15]. Используя представления свободного объема нам удалось описать экспериментальные значения КЛД в смесевых

бислоях, полагая, что при смешении липидов происходит усреднение свободных объемов их молекул, соответствующих их однокомпонентным бислоям.



**Рис. 5.** А. ДЗ бислоев эквимольных смесей липидов. Б. Диаграмма с соответствующими КЛД.

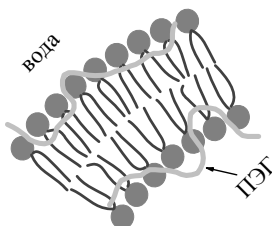
В случае образования однородного липидного бислоя из смеси ДОФХ и СМ следует ожидать, что межмолекулярные контакты будут распределены в бислой равномерно. В таком случае доли контактов: СМ-СМ (25%), СМ-ДОФХ (50%), ДОФХ-ДОФХ (25%). Однако известно, что взаимодействие в контакте СМ-СМ сильнее, чем в двух других, а значит наблюдаемая в случае однородной смеси бислоя средняя площадь, занимаемая молекулой липида, должна быть меньше среднего арифметического их площадей, что находится в противоречии с наблюдаемым на эксперименте. Таким образом, предположение о том, что в эквимольных смесях СМ с ДПФХ происходит однородное смешение липидов неправомерно. Такая ситуация может найти объяснение, если предположить, что в бислоях ДОФХ-СМ происходит образование латеральных доменов СМ с повышенной плотностью упаковки, однако время жизни таких доменов меньше временного разрешения эксперимента ЯМР ИГМП, а их размеры невелики.

Развивая далее эти представления на случай «канонической смеси» ДОФХ-СМ-ХОЛ, можно заключить, домены уже присутствуют в смеси ДОФХ-СМ, а присутствие холестерина стабилизирует и приводит к увеличению размеров этих доменов. Кроме этого, анализируя наши и литературные данные по системам ФХ-ХОЛ, природные СМ, СМ-ХОЛ, ФХ-СМ и ДОФХ-СМ-ХОЛ можно отметить зависимость между свободной поверхностью молекулы в бислое и жидкостным латеральным фазовым разделением с образованием стабильных доменов упорядоченной фазы.

**Четвертая глава. «Влияние макромолекул на латеральную диффузию липидов в бислоях»** содержит оригинальные экспериментальные результаты исследования взаимодействия синтетических и био- полимера с модельными липидными мембранами фосфолипидов.

Отличительными особенностями полиэтиленгликоля являются его электронейтральность, высокая гидрофобность и способность образовывать водородные связи. Исследовали системы ДМФХ-ПЭГ. По данным спектров  $^{31}\text{P}$  и  $^1\text{H}$  ЯМР везикул и ориентированных мультибислоев было установлено, что присутствие ПЭГ не изменяет фазовую организацию ДМФХ. Применение ДСК

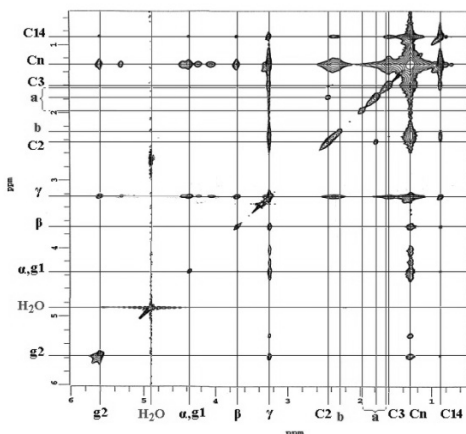
показало, что ПЭГ не изменяет кооперативность фазового перехода гель-жидкость липидной мембраны, однако понижает температуру этого перехода примерно на 1°C. Анализ ориентационной зависимости спектров  $^1\text{H}$  ЯМР ориентированных мультибислоев липида демонстрирует, что ПЭГ разупорядочивает часть гидрофобной области липидного бислоя вблизи раздела гидрофобной и полярной областей (интерфазы). При исследовании латеральной диффузии методом ЯМР было установлено, что взаимодействие полимера с липидной мембраной не изменяет параметры латеральной диффузии ДМФХ (КЛД и  $E_D$ ). Из анализа спектров  $^{31}\text{P}$  ЯМР ориентированных образцов установлено, что в присутствии ПЭГ происходит также разупорядочивание части полярных групп липида, причем эффект проявляется только в ограниченной области отношений количества сегментов ПЭО к количеству молекул липида (до 1). Этот эффект был объяснен влиянием неоднородного поля сил, действующих на фосфатные головы липида со стороны полимера «заглубленного» в бислой вблизи интерфазы при относительно небольшой концентрации полимера. В целом, проведенные исследования позволяют создать представление о расположении молекул полимера в бислое, изменении термодинамических свойств бислоя и динамики молекул липида в присутствии нейтрального полимера (Рис.6).



**Рис.6.** Схематическое представление о расположении молекул ПЭГ в липидном бислое, полученное из анализа данных ДСК,  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии,  $^{31}\text{P}$  ЯМР спектроскопии и  $^1\text{H}$  ЯМР диффузометрии.

Полиакриловая кислота представляет собой гидрофильный анионный полимер. Анионная природа ПАК объясняется наличием  $-\text{COOH}$  группы в составе цепи полимера, которая в водной среде частично диссоциирует, в результате этого ПАК приобретает избыточный отрицательный заряд. С одной стороны, факт наличия взаимодействия ПАК с липидной мембраной на сегодняшний день практически не подвергается сомнению [16-19]. Более того, существуют литературные данные [19], свидетельствующие о влиянии ПАК на проницаемость липидного бислоя: в присутствии ПАК проницаемость бислоя резко возрастает при значениях  $\text{pH} < 5$  и возвращается к нормальному значению при  $\text{pH} \sim 7$ . В то же время о молекулярных механизмах взаимодействия ПАК с липидами бислоя до сих пор практически ничего не известно. В рамках данной главы мы исследовали взаимодействие ПАК с бислоями ДМФХ с помощью комплекса методов двумерного NOESY ЯМР, ДСК, исследовали влияние ПАК на характер латеральной подвижности липидного бислоя ДМФХ с помощью метода ЯМР с ИГМП.

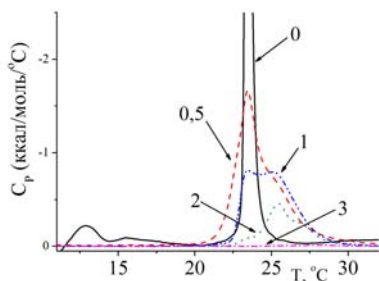
С помощью двумерной NOESY спектроскопии была получена информация о пространственном расположении ПАК относительно бислоя. Характерный вид NOESY спектров для системы приведен на рис.5.



**Рис.7.** Спектр NOESY для мультислойных липосом содержащих избыточное количество ПАК 5кДа, T=40°C.

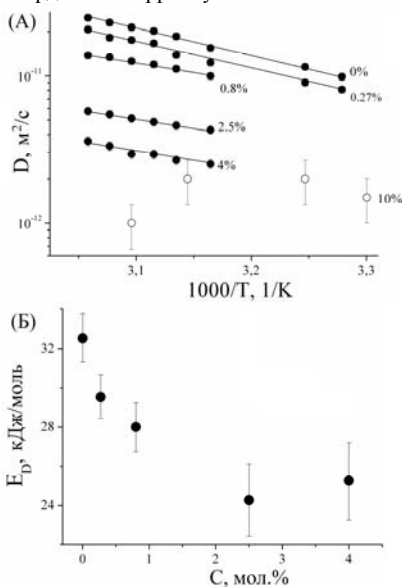
Соотнесение пиков на спектрах NOESY производилось с использованием литературных данных. Анализ 2D спектра показал, что кросспики, соответствующие переносу намагниченности между полимером и липидом наблюдаются только для химических групп интерфазы бислоя. На основании чего был сделан вывод о преимущественно поверхностном характере взаимодействия ПАК с липидной мембраной с расположением полимера на уровне интерфазы бислоя. Далее мы провели исследование влияние ПАК на фазовое состояние липидов методом ДСК. Полученные термограммы приводятся на рис. 8.

При 12,4 °C наблюдается небольшой пик, соответствующий так называемому предпереходу, а при 23,5 °C наблюдается непосредственно плавление липида – переход ДМФХ из гель-фазы в жидкокристаллическую. Проведенный анализ термограмм показал, что добавление в систему ПАК сопровождалось исчезновением пика, соответствующему предпереходу, уменьшению энтальпии и существенному усложнению формы пика, соответствующего фазовому переходу  $L_{\beta}$ - $L_{\alpha}$ . В присутствии ПАК в области, соответствующей фазовому переходу  $L_{\beta}$ - $L_{\alpha}$ , можно различить две линии. Одна из них имеет ширину и положение (23,5°C) аналогичное везикулам ДМФХ в отсутствии ПАК, при этом ее доля уменьшается с ростом концентрации полимера в системе. Вторая линия имеет большую ширину и расположена при более высоких значениях температуры ~ 25,5°C. Увеличение концентрации полимера в системе приводит к полному исчезновению наблюдаемых термических эффектов. Данные результаты свидетельствуют о том, что присутствии в системе ПАК в концентрациях до ~3 мол.% часть липидов в бислое остается в том же состоянии как и в отсутствии полимера, в то же время другая часть липидов формирует новую фазу (или фазы) с более высокими значениями  $T_m$  и меньшей кооперативностью фазового перехода.



**Рис.8.** Термограммы ДСК для системы ДМФХ/ПАК. Концентрация ПАК в системе приведена в мол.%

Исследования влияния ПАК на особенности латеральной подвижности в бислоях производились на макроскопически ориентированных бислоях ДМФХ. Полученные ДЗ имели моноэкспоненциальную форму, как в бислоях чистого ДМФХ, так и в присутствии ПАК. Полученные в результате разложения ДЗ значения КЛД приведены на рис. 9.А в виде температурных зависимостей в координатах Аррениуса.



**Рис. 9.** (А) Температурная зависимость КЛД ДМФХ в присутствии ПАК, концентрации ПАК приведены на графике; (Б) Зависимость энергии активации диффузии молекул ДМФХ от концентрации ПАК в системе

Как видим, за исключением образца, содержащего максимальное (из исследованных) значение концентрации ПАК, температурные зависимости значений КЛД имеют линейный вид в представленных координатах, и, следовательно, мы можем определить значение энергии активации латеральной

диффузии. Полученные значения энергий активации представлены на рис. 9.Б в виде зависимости от концентрации ПАК в системе. Как видим рост концентрации ПАК приводит к уменьшению значений энергии активации латеральной диффузии молекул ДМФХ. Так, при увеличении концентрации ПАК в системе от 0 до значений больших, чем 2 мол.% значение энергии активации уменьшается практически на 25%.

Совокупность полученных результатов позволила предложить модель взаимодействия ПАК с липидной мембраной. Так, в присутствии в системе ПАК в липидном бислое образуется новая латеральная фаза, обладающая отличными от чистого ДМФХ термодинамическими характеристиками: более высокими значениями  $T_m$  меньшими  $\Delta H$ . При концентрациях полимера в системе до 4 мол.%, ПАК целиком адсорбируется на поверхности бислоя и появление новой латеральной фазы объясняется взаимодействием части липидов, образующих бислой с полимером. При значениях концентрации ПАК превышающих 4 мол.%, по-видимому наблюдается ситуация, при которой с одной стороны вся поверхность бислоя взаимодействует с полимером, однако при этом, полимерные цепи ПАК покрывают бислой частично, т.е. часть сегментов, составляющих полимерную молекулу с бислоем не взаимодействуют. Экспоненциальная форма наблюдаемых ДЗ свидетельствует об усреднении КЛД в системе, по-видимому, связанном с молекулярным обменом между липидами, входящими в разные фазы, со временем обмена меньшим, чем длительность эксперимента ЯМР (~100 мс). Наблюдаемое же уменьшение значений энергии активации диффузии в системе, при росте концентрации ПАК в системе может быть объяснено как минимум двумя причинами. С одной стороны, уширение диапазона фазового перехода  $L_\beta \rightarrow L_\alpha$ , вызванное присутствием ПАК в системе может приводить к уменьшению изменению доли молекул липидов, дающих вклад в наблюдаемый сигнал ЯМР. С другой – присутствие в системе полимера может привести к изменению основной диффундирующей единицы. Так, если в бислоях, не содержащих ПАК, мы наблюдали за латеральной диффузией свободных молекул липидов, то в присутствии полимера речь может идти о диффузии надмолекулярных комплексов, содержащих в своем составе несколько молекул липидов и ПАК.

В отличие от ПЭГ и ПАК полилизин (ПЛ) является биополимером и поликатионом. Также как и в случае ПЭО и полианионов в присутствии полимера нейтральные фосфатидилхолины, а также анионный фосфатидилглицерин, согласно  $^{31}\text{P}$  ЯМР, образуют ламеллярную фазу. Пентализин ( $M=0,66$  кДа) не оказывает влияния на латеральную диффузию липидов, в то время как в присутствии высокомолекулярного ПЛ ( $M=25,2$  кДа) на ДЗ появляется дополнительная компонента с пониженным КЛД населенность которой зависит от концентрации ПЛ. Результат анализа ДЗ на две компоненты приведен на Рис.11.



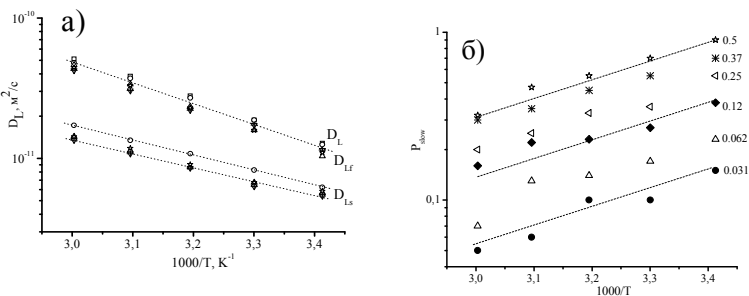


Рис. 11. Температурные зависимости: а) КЛД ( $D_L$ ) ДОФГ, быстрой ( $D_{Lf}$ ) и медленной ( $D_{Ls}$ ) компонент КЛД в бислоях ДОФГ с ПЛ. Пунктирные линии - наилучшая аппроксимация экспериментальных результатов. Кажущаяся энергия активации для быстрой компоненты составляет 27,9 кДж/(моль·К), для медленной компоненты -17,8 кДж/(моль·К). ■-ДОФГ; ● -ДОФГ+ПЛ, 1:0,062; ▲-ДОФГ+ПЛ, 1:0,125; ★- ДОФГ+ПЛ, 1:0,25; ▼- ДОФГ+ПЛ, 1:0,5; б) Населенности компоненты с пониженным коэффициентом латеральной самодиффузии

Анализ формы ДЗ показал, что латеральная диффузия в бислоях ДОФГ и ДОФХ в присутствии ПЛ описывается двумя компонентами КЛД, отличающимися по значению в 2.7-3 раза, и названных, соответственно, «медленной» и «быстрой» компонентами. Доля «медленной» компоненты увеличивается с ростом концентрации ПЛ в системе. Значение и вид температурной зависимости «быстрой» компоненты соответствует диффузии липидов в отсутствии ПЛ. Таким образом «медленная» компонента ассоциирована с долей липидов взаимодействующих с ПЛ. Увеличение в ~5 раз населенности медленной компоненты в бислоях заряженного ДОФГ в сравнении с ДОФХ позволяют сделать вывод о преимущественно электростатической природе взаимодействия между ПЛ и липидами. Зависимости формы ДЗ от времени диффузии не наблюдалось.

В результате работы предлагается модель взаимодействия ПЛ с бислоем, согласно которой происходит адсорбция полилизина на поверхности бислоя и образование латеральных доменов, при этом липиды не образуют долговременных контактов с полипептидом, поэтому движущейся единицей является молекула липида, а не комплекс. Однако, при адсорбции полипептида меняются свойства подфазы, которые приводят к понижению КЛД липидов в пределах подфазы (доменов).

### ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

Методами дифференциальной сканирующей калориметрии, <sup>1</sup>H, <sup>31</sup>P одно- и двумерной ЯМР спектроскопии и ЯМР диффузометрии проведено комплексное экспериментальное исследование динамических свойств, фазовых переходов и структуры мультибислоев фосфолипидов, их двухкомпонентных смесей, а также мультибислоев фосфолипидов содержащих нейтральные и заряженные макромолекулы.

1. Обнаружена зависимость ширины распределения коэффициентов латеральной диффузии от степени неоднородности молекул по

длине и насыщенности углеводородных цепей природных сфингомиелинов различного происхождения. Установлено, что между динамической неоднородностью бислоев и их структурной неоднородностью может быть соответствие. Проведен анализ возможных причин найденной зависимости, в результате чего предложена модель доменной структуры бислоя, предусматривающая выделение в отдельные домены молекул липидов, обладающих схожим химическим строением.

2. Обнаружено сближение коэффициентов латеральной диффузии в бислоях из смесей фосфатидилхолинов различных молекулярных масс и фосфатидилхолина со сфингомиелинами. Показано, что эффект усреднения коэффициентов самодиффузии может быть описан исходя из модели свободного объема, полагая, что при смешении липидов происходит усреднение свободных объемов их молекул, соответствующих их однокомпонентным бислоям. Основываясь на полученной зависимости коэффициентов латеральной диффузии в липидных бислоях от свободного объема молекул в бислое, обнаружено несоответствие свободного объема сфингомиелина молока и свободного объема его молекулы, известной из литературы.

3. Установлено, что присутствие нейтрального полимера полиэтиленгликоля в мультибислоях фосфатидилхолина приводит к понижению температуры и уменьшению кооперативности фазового перехода гель-жидкость, при этом фосфолипид сохраняет ламеллярную фазу с преимущественной ориентацией фосфатной группы по нормали к бислою. Показано, что наиболее вероятным местом адсорбции ПЭО на липидной мембране является область интерфазы между ее гидрофобной и полярной областями.

4. Показано, что присутствие полиакриловой кислоты (ПАК) не изменяет ламеллярной структуры липидного бислоя. При концентрациях ПАК до 4 моль % появляется новая латеральная фаза с более высокой температурой, пониженной кооперативностью и энтальпией фазового перехода гель-жидкость, более низкими значениями коэффициентов латеральной диффузии липидов и энергии активации самодиффузии.

5. На основании  $^{31}\text{P}$ ,  $^1\text{H}$ , двумерной ЯМР спектроскопии и самодиффузии в модельных мембранах фосфатидилхолинов, модифицированных полиакриловой кислотой (ПАК) установлено, что ПАК не способен проникнуть вглубь бислоя, а способность ПАК обратимо менять проницаемость липидного бислоя связана с дефектами в липидном бислое, образующимися в результате взаимодействия полимера с головными группами липидов.

6. Изучена латеральная диффузия в ориентированных бислоях цвиттерийонного (фосфатидилхолин) и анионного (фосфатидилглицерин) липидов в присутствии катионного полипептида полилизина (ПЛ). В присутствии полилизина наблюдается спектр коэффициентов диффузии липидов. Анализ формы ЯМР спектра, интенсивности сигналов, зависимости формы затухания от времени диффузии показывают, что наиболее вероятной причиной появления спектров КЛД является образование доменов бислоев при адсорбции ПЛ в результате электростатического взаимодействия с липидами.

## **СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**

1. И.Ю.Десятникова, Б.В.Мунавиров, А.В.Филиппов Исследование диффузии липидов в бислоях при их взаимодействии с заряженным протеином // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. - 2009. - Т. 151, кн. 1. - С. 173-187.
2. A.V. Filippov, M.A. Rudakova, B.V. Munavirov Lateral diffusion in sphingomyelin bilayers. // Magn. Reson. Chem. 2010. V.48. P.945 – 950.
3. A. Filippov, B. Munavirov, T. Sparrman, V. Ishmuhametova, M. Rudakova, P. Shriram, S. Tavelin Interaction of polyacrylic acid oligomer with dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. // Langmuir. 2011. V.27.N.7. P.3754-3761.
4. A. Filippov, B. Munavirov, G. Gröbner, M. Rudakova Lateral diffusion in bilayers of equimolar mixtures of natural sphingomyelins with dioleoylphosphatidylcholine. // Magn. Reson. Imag. 2012. V.30. P.413-421.
5. A. Filippov, B. Munavirov, O. Antzutkin Phase transition, ordering and lateral diffusion in phospholipid bilayers in the presence of poly ethylene oxide. // Mendeleev Commun. 2012. V.22.N.5.
6. A. Filippov, B. Munavirov, B. Gizatullin, O. Antzutkin, Disordering of phospholipid headgroups induced by a small amount of polyethylene oxide. // Magn. Reson. Chem. 2013. V51. P.1-3.

#### СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Singer, S.J. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes / S.J. Singer, G.L. Nicolson // Science. - 1972. - V.175, N.4023. - P.720-731.
2. Simons, K. Functional rafts in cell membranes / K. Simons, E. Ikonen // Nature – 1997. – V.387. – P.569-572.
3. Dietrich, C. Lipid rafts reconstituted in model membranes / C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson, E. Gratton // Biophys. J. – 2001. – V. 80. – P. 1417-1428.
4. Michel, V. Lipid rafts in health and disease / V. Michel, M. Bakovic // Biol. Cell. – 2007. - V.99. – P.129-140.
5. Ahmed, S. N. On the origin of sphingolipid/cholesterol- rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes / S. N. Ahmed, D. A. Brown, E. London // Biochemistry – 1997. – V. 36. – P.10944-10953.
6. Epand, R. M. Do proteins facilitate the formation of cholesterol-rich domains? / R. M. Epand // Biochim. Biophys. Acta – 2004. – V. 1666. - P.227-238.
7. Yessine, M.-A. Membrane-destabilizing polyanions: interaction with lipid bilayers and endosomal escape of biomacromolecules / M. - A. Yessine, J. - C. Leroux // Adv. Drug Delivery Rev. – 2004. – V.56. – P.999-1021.
8. Chary K.V.R. NMR in Biological Systems: From Molecules to Human / K.V.R. Chary, G. Covil // Dordrecht: Springer, 2008. – P.521.
9. Филиппов, А.В. Самодиффузия в липидных мембранах в присутствии холестерина / А.В.Филиппов, В.Д.Скирда, М.А.Рудакова // Казань: Интерграфика, 2010. – 226 с.
10. Orädd, G. NMR in macroscopically oriented lyotropic systems / G. Orädd, G. Lindblom // Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. – 2003 – Chapter 18. – P.399-418.

11. Stilbs, P. Global least-squares analysis of large, correlated spectral data sets: application to component-resolved FT-PGSE NMR spectroscopy / P. Stilbs, K. Paulsen, P. Griffiths // J. Phys. Chem. – 1996 – V.100. – P.8180-8189.
12. Byrdwell, W. G. Liquid chromatography with dual parallel mass spectrometry and P-31 nuclear magnetic resonance spectroscopy for analysis of sphingomyelin and dihydrosphingomyelin - I. Bovine brain and chicken egg yolk / W. G. Byrdwell, R. H. Perry // J. Chromatogr. A – 2006. – V. 1133. – P. 149-171.
13. Filippov, A. Lateral diffusion of saturated phosphatidylcholines in cholesterol-containing bilayers / A. Filippov, M. Rudakova, G. Orädd, G. Lindblom // Biophysics. – 2007. – V.52,N.3. – P.307-314.
14. Vaz, W. L. C. Translational diffusion of lipids in liquid crystalline phases phosphatidylcholine multibilayers. A comparison of experiment with theory / W. L. C. Vaz, R. M. Glegg, D. Hallman // Biochemistry. – 1985. – V. 24. – P.781786.
15. Lindblom, G. Lipid lateral diffusion and membrane heterogeneity / G. Lindblom, G. Orädd // Biochim. Biophys. Acta – 2009. – V. 1788. – P.234-244.
16. Felber, A.E. PH-sensitive vesicles, polymeric micelles, and nanospheres prepared with polycarboxylates / A.E. Felber, M.H. Dufresne, J.C. Leroux // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2012. – V.64. – P.979-992.
17. Filippov, A.V. Effect of polyacrylic acid on phase state of lipids and diffusion in lipid-water system / A.V. Filippov, A.V. Suleymanova, and A.A. Berkovich // Applied Magnetic Resonance. – 2008. – V.33. – P.311-322.
18. Fujiwara, M. Characterization of pH-dependent poly(acrylic acid) interaction with vesicles / M. Fujiwara, R.H. Grubbs, J.D. Baldeschwieler // American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry. – 1991 – V.32. – P.275.
19. Berkovich, A.K. Interaction of polyanions with electroneutral liposomes in a slightly acidic medium / A.K. Berkovich, V.N. Orlov, N.S. Melik-Nubarov // Polymer Science - Series A. – 2009. – V.51. – P.648-657.

#### **Автор выражает благодарность**

- Научному руководителю проф. Филиппову А.В. и заведующему кафедрой проф. В.Д.Скирге за помощь в постановке задачи исследования, продуктивные дискуссии и помощь в обсуждении результатов исследований.
- Коллективу кафедры физики молекулярных систем КФУ и коллективу кафедры проектирования устойчивых процессов технологического университета Лулеа (Швеция) за поддержку и помощь во время подготовки материалов диссертации.
- Научно-образовательному центру КПФУ (гранты РНП 2.1.1.3222, 2.2792.2011 и 02.740.11.0702), Российскому фонду фундаментальных исследований (гранты 09-04-01355 и 12-04-00011).